

## EFFET DE L'ADAPTATION PROGRESSIVE À LA LUZERNE D'UN ISOLAT DE *VERTICILLIUM DAHLIAE* (D'ORIGINE TOMATE) SUR LA SYNTHÈSE *IN VITRO* DE SES ENZYMES PECTOCELLULOLYTIQUES

A. EL AISSAMI, F. BRHADA et H. LAHLOU

Département de Biologie,  
Faculté des Sciences de Rabat,  
B.P. 1014., Rabat,  
Maroc.

**RÉSUMÉ** — À la suite de passages successifs d'un isolat de *Verticillium dahliae* d'origine tomate chez des luzernes résistantes, certains mécanismes d'action du parasite sont affectés, tels que : la synthèse des protéines et des enzymes pectocellulolytiques. Le taux de protéines a diminué et l'activité cellulase est progressivement réduite, sous la pression de l'hôte luzerne, pour disparaître chez l'isolat adapté à ce dernier. Cette perte est compensée par l'acquisition progressive d'activités pectinases.

**MOTS CLÉS** : *Verticillium dahliae*, luzerne, tomate, protéines, enzymes pectocellulolytiques.

**ABSTRACT** — After several passages of a *Verticillium dahliae* isolate from tomato into a resistant lucerne, the parasitic mechanism of action reveals the new host induced a pressure into the pathogen. Such affected the synthesis of protein and pectocellulolytic enzymes activities. The protein content decreased and the cellulase activity was progressively reduced until it disappeared totally. The loss of cellulase activity was compensated by a gradual gain on pectinase activity.

**KEY WORDS** : *Verticillium dahliae*, lucerne, tomato, protein, pectocellulolytic enzymes.

### INTRODUCTION

Le champignon *Verticillium albo-atrum* cause de sévères symptômes et éventuellement la mort des plants de luzerne (Page *et al.*, 1992). Des études menées dans notre laboratoire ont montré qu'après plusieurs passages sur la luzerne, un isolat de *Verticillium dahliae* d'origine tomate, acquiert progressivement l'aptitude à coloniser tous les organes de la nouvelle plante hôte et d'induire même des symptômes caractéristiques de la verticilliose (El Aissami, 1990). Cette modification du pouvoir pathogène s'accompagne de changements morphologiques.

Les mécanismes physiologiques régissant les interactions entre les parasites et leurs hôtes sont assez connus. Ainsi, chez l'agent pathogène, ce sont les enzymes et les toxines qui déterminent une grande part de l'agressivité. La différence du niveau d'agressivité de diverses races d'un parasite, est due en général à la différence de leurs aptitudes à produire ces métabolites (Sebti, 1982).

L'infection par *Verticillium albo-atrum* augmente l'activité enzymatique chez la luzerne (Pennypacker *et al.*, 1994). Whitney *et al.* (1972) ont suggéré que la carboxyméthylcellulase est produite par ce champignon et d'autant plus que l'infection de la luzerne est forte. Des cellulases et des pectinases, produites à la suite de l'infection par *Verticillium* dans les vaisseaux des plantes, peuvent être élaborées également *in vitro* (Durrand & Cooper, 1988). Ces enzymes extra cellulaires sont faciles à détecter en culture fongique pure (Arima *et al.*, 1972 ; Kratka, 1980).

Il ressort de tout ce qui précède que *Verticillium dahliae* offre un matériel intéressant pour faire une approche biochimique dans le but de voir si la pression de l'hôte luzerne, touche certaines facultés des différents isolats plus ou moins adaptés à cette plante, notamment la synthèse de protéines et l'activité de certaines enzymes pectocellulolytiques. Néanmoins, en raison du fait que la reconnaissance de l'existence de ces deux *Verticillium* ne fut admise que récemment, les données antérieures relatives aux *V. dahliae* et *V. albo-atrum* doivent être analysées avec précaution.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Le parasite

Les expériences sont faites avec divers isolats de *Verticillium* :

\* P<sub>3</sub>.S : Isolat marocain de *Verticillium dahliae* (d'origine tomate) très pathogène sur la tomate, non pathogène sur la luzerne.

\* L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, L<sub>6</sub>, L<sub>7</sub>, L<sub>8</sub>, L<sub>9</sub> : Isolats issus de P<sub>3</sub>.S à la suite d'inoculations et de réisolements successifs sur luzerne, l'indice accompagnant la lettre L indique le nombre de passages sur cette plante.

\* E<sub>27</sub> : Isolat de *Verticillium albo-atrum* d'origine luzerne fourni aimablement par le laboratoire de pathologie végétale de l'I.N.A de Paris Grignon ; il provoque des symptômes sévères sur luzerne (El Aissami, 1990).

### Préparation des filtrats de culture

Les isolats fongiques sont cultivés dans des erlenmeyers (250 ml) contenant 100 ml d'un milieu dont la composition par litre est la suivante : 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O ; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O ; 0,05 g de KCl ; 2 g de NaNO<sub>3</sub> ; 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 40 µg de ZnSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O ; 8 µg de MnSO<sub>4</sub>. 4H<sub>2</sub>O ; 4 µg de NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. 10H<sub>2</sub>O ; 2 µg de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>. 10H<sub>2</sub>O ; 2 µg de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> et 375 µg de vitamine B1. Le glucose (1,5 % P/V) ou bien la pectine (1 % P/V) sont utilisés comme seule source de carbone.

Les cultures sont incubées à 25° C et à l'obscurité sur un agitateur rotatif à 100 tours/minute. Le pH est ajusté à 5,9 par addition de NaOH. Le milieu est autoclavé à 120° C pendant 20 minutes. Chaque erlenmeyer est ensemencé par 50 000 spores obtenues sur des précultures fraîches de l'isolat à étudier. Les filtrats de culture sont recueillis 15 jours après inoculation, délai nécessaire pour obtenir une concentration protéique maximale.

Le mycélium et les spores sont éliminés par centrifugation à 8 000 g pendant 10 minutes (Langen *et al.*, 1992), la filtration finale est faite sur filtre millipore 0,22 µm, ce qui élimine toute trace de mycélium.

### Poids sec du mycélium

Le mycélium obtenu après centrifugation et filtration est séché à 80° C pendant 48 heures, pour déterminer le poids sec.

### Dosage des Protéines

Il fait appel à une précipitation acétonique (Chaib, 1987), le précipité obtenu sert pour détecter les protéines synthétisées par les divers isolats et diffusées dans le milieu de culture. La quantité de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1984).

### Activité enzymatique

#### Milieux de mise en évidence

Ce test quantitatif est basé sur la diffusion radiale des enzymes dans un substrat gélosé de 5 mm d'épaisseur. 50 µl de filtrat à tester sont déposés dans des puits, de 4 mm de diamètre, faits à l'emporte pièces dans des boîtes de Petri contenant un substrat gélosé, approprié à l'activité enzymatique recherchée. Les filtrats de culture autoclavés ont servi de témoin (Saksirate & Hoppe, 1991). Les valeurs obtenues sont la moyenne de vingt répétitions.

\* Pectine méthyle estérase — Pectine (pectin apple) : 0,5 % ; Agar noble : 1,5 % ; Tampon citrate phosphate pH = 6,5

\* Pectine trans éliminase — Acide polygalacturonique : 0,5 % ; Agar noble : 1,5 % ; CaCl<sub>2</sub> Tris 0,1 M pH = 8,6

\* Carboxyméthylcellulose — Carboxyméthylcellulose : 0,5 % ; Agar noble : 1,5 % ; Tampon Tris 0,1 M pH = 5

#### Révélation

■ Pectine méthyle estérase : les boîtes sont submergées d'acide malique 0,1 M et laissées sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. L'acide malique est remplacé par une solution aqueuse de rouge de ruthénium 0,02 %. Après une nuit de coloration, un halo rose entoure les puits indiquant l'activité de l'enzyme recherchée.

\* Pectine trans éliminase : la technique précédente donne des zones translucides sur un fond blanc, le contraste n'est pas toujours net pour faire les mesures. L'activité enzymatique est estimée alors par la densité optique. Le mélange de la réaction contient 1,5 ml de filtrat de culture, 2,5 ml de pectine (1 % P/V) 0,1 M de Tris HCl à pH = 9 et 1 ml

de  $\text{CaCl}_2$  0,105 M. L'incubation est faite à 30° C pendant 75 min, 0,67 ml de HCl 0,1 N et 1,33 ml d'acide thiobarbithurique 0,04 M, sont ajoutés au mélange. Le tout est chauffé à 100° C et soumis à une centrifugation à 10 000 g pendant 12 min. L'activité pectine trans éliminase est donnée directement par la densité optique à 550 nm. Une unité d'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme capable de transformer 1  $\mu\text{moie}$  de substrat / min (Jerebzoﬀ-Quintin & Jerebzoﬀ, 1980).

\* Carboxyméthylcellulase : les boîtes sont inondées par une solution de rouge Congo à 1 % pendant 25 min sous agitation. Cette solution est remplacée par du NaCl 1M pendant 15 min sous agitation. Ces bains successifs sont réalisés trois fois, avant le dernier bain de NaCl 1M qui dure une nuit. L'activité enzymatique est représentée par un halo clair sur un fond rouge

## RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

### Dosage des protéines des isolats de *Verticillium albo-atrum*

#### Filtrats de culture

La quantité de protéines contenues dans le filtrat brut de  $P_3.S$  est nettement supérieure à celle des protéines contenues dans les filtrats des autres isolats.

La figure 1 montre que, quelle que soit la source de carbone, le taux de protéines diminue en fonction du nombre de passages de  $P_3.S$  sur la luzerne, les valeurs enregistrées pour  $L_9$  et  $E_{27}$  sont semblables. En effet  $P_3.S$  renferme la même quantité de protéines la plus importante, 3 mg/ml, et celle-ci diminue pour atteindre 0,54 mg/ml chez la lignée  $L_9$  (fig. 1)

Les quantités de protéines détectées dans le milieu, en présence de pectine, sont inférieures à celles enregistrées en présence du glucose.

#### Précipité acétonique

Les dosages montrent que les valeurs (chaque valeur représente la moyenne de quatre précipitations) enregistrées par  $P_3.S$  et  $L_1$ , plus ou moins semblables, diminuent en fonction du nombre de passages de  $P_3.S$  (d'origine tomate) sur la luzerne. Les précipités acétoniques de  $L_9$  et  $E_{27}$  renferment la même quantité de protéines à 0,2 mg/ml près, que ce soit sur glucose ou sur pectine. Notons, toutefois que sur glucose, la quantité des protéines détectées y est supérieure.

Le bilan de ce dosage montre que la synthèse des protéines diminue en fonction du nombre de passages de la souche tomate sur luzerne d'une part et en fonction de la nature de la source de carbone d'autre part.

#### La croissance mycélienne

Les isolats issus des différents passages sur luzerne, ont une croissance mycélienne de plus en plus importante. La nature de la source de carbone n'a pas d'effet sur le sens de la variation de la croissance mycélienne ; elle agit au niveau de son intensité.

En effet, sur milieu minimum plus pectine, les isolats se développent moins bien que lorsqu'ils utilisent le glucose. Le poids sec de P<sub>3</sub>.S sur pectine est de 80 mg/100 ml ; sur glucose, il est de 100 mg/100 ml. Le poids mycélien des isolats *Verticillium* augmente en fonction du nombre de passages des isolats de P<sub>3</sub>.S sur la luzerne, pour atteindre respectivement 120 et 172 mg/100 ml du milieu sur pectine et sur glucose (fig. 2).

Cette estimation du poids sec du mycélium correspond à la moyenne de dix répétitions.

### Activités enzymatiques

\* Pectine méthyle estérase (tableau 1) : les tests des lignées P<sub>3</sub>.S, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> et L<sub>4</sub> sont négatifs que ce soit sur pectine ou bien sur glucose, aucune activité enzymatique n'a donc été détectée. La lignée L<sub>5</sub> présente un diamètre d'activité Pectinase relativement faible, après avoir été cultivée sur les deux milieux. Mais sur pectine, le diamètre est plus important. On note une augmentation progressive de ce diamètre chez les isolats L<sub>6</sub>, L<sub>7</sub> et L<sub>8</sub> ; elle devient maximale chez L<sub>9</sub>, dépassant légèrement celui de E<sub>27</sub>, mais la comparaison statistique reste non significative. L'activité pectine méthyle estérase non détectée pour P<sub>3</sub>.S, d'origine tomate (du moins *in vitro*) est devenue très évidente chez L<sub>9</sub> (isolat adapté à la luzerne) rappelant même celle de E<sub>27</sub> (isolat d'origine luzerne).

\* Pectine trans éliminase : cette activité, dosée par la densité optique (moyenne de dix lectures), n'est pas détectée pour P<sub>3</sub>.S et L<sub>1</sub> sur le milieu minimum plus glucose ; elle est très faible sur pectine (fig.3). Cette activité enzymatique augmente également en fonction du nombre de passages de P<sub>3</sub>.S sur luzerne, pour devenir maximale chez L<sub>9</sub> et E<sub>27</sub>.

\* Sur pectine, les valeurs sont plus élevées que sur glucose (fig. 3). Néanmoins on note une augmentation très marquée chez L<sub>9</sub>, il a suffi d'un seul passage de L<sub>8</sub> sur luzerne pour que l'activité pectinase double en présence de pectine.

\* Sur glucose, l'augmentation de l'activité enzymatique se fait progressivement en fonction du nombre de passages P<sub>3</sub>.S sur l'hôte luzerne.

Isolats de <i>Verticillium albo-atrum</i>	Pectine	Glucose
P <sub>3</sub> .S	0	0
L <sub>1</sub>	0	0
L <sub>2</sub>	0	0
L <sub>3</sub>	0	0
L <sub>4</sub>	0	0
L <sub>5</sub>	2.50 ± 0.10 a	1.60 ± 0.10 a
L <sub>6</sub>	3.00 ± 0.20 a	1.80 ± 0.10 a
L <sub>7</sub>	10.00 ± 0.20 b	7.00 ± 0.20 b
L <sub>8</sub>	17.00 ± 0.30 c	10.00 ± 0.20 b
L <sub>9</sub>	27.00 ± 0.40 d	19.00 ± 0.20 c
E <sub>27</sub>	25.00 ± 0.40 d	19.00 ± 0.30 c

Tableau 1 — Activité pectine méthyle estérase estimée par le diamètre du halo (en mm), pour 11 isolats.

Table 1 — Pectine methyl esterase activity estimated by the diameter of the clear zone (in mm) of 11 isolates.

\* Carboxyméthylcellulase : Cette activité a été recherchée dans les filtrats de culture utilisés pour la recherche des pectinases.

Le tableau 2 montre qu'aucune trace de cellulase n'a été révélée dans le milieu minimum plus pectine. Sur glucose, le diamètre de l'activité enzymatique de P<sub>3</sub>.S est de 9,25 ± 0,47 mm ; il diminue progressivement chez les isolats de plus en plus " adaptés " à la luzerne. En effet, chez L<sub>7</sub> le diamètre est de 6 mm, au delà duquel l'activité cellulolytique n'a pas été révélée. Après neuf passages sur luzerne, P<sub>3</sub>.S ne présente aucune activité cellulase sur glucose. L'activité cellulase est donc observée sur glucose et non sur pectine, elle est donc induite par la première source de carbone et non par la deuxième.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude montre que les passages successifs d'un isolat de *Verticillium dahliae*, d'origine tomate, sur luzerne, provoquent en plus des modifications du pouvoir pathogène (El Aïssami, 1990), des changements touchant la synthèse des protéines et les activités enzymatiques. En effet, la quantité de protéines excrétées dans le milieu (ex : enzymes) (*in vitro*) par les différents isolats, diminue progressivement avec l'augmentation du nombre de passages de P<sub>3</sub>.S sur luzerne ; elle devient alors très proche de celle sécrétée par l'isolat de *Verticillium* d'origine luzerne.

Isolats de <i>Verticillium albo-atrum</i>	Pectine	Glucose
P3.S	0	9,25 ± 0,47 a
L1	0	8,75 ± 0,47 a
L2	0	8,00 ± 0,40 a
L3	0	7,75 ± 0,25 a
L4	0	7,50 ± 0,50 a
L5	0	7,25 ± 0,47 a
L6	0	6,25 ± 0,47 a
L7	0	6,00 ± 0,62 a
L8	0	0
L9	0	0
E27	0	0

Tableau 2 — Activité carboxyméthylcellulase (CMC), estimée par le diamètre de la zone claire (en mm) de 11 isolats.

Table 2 — CMC activity estimated by the diameters of the clear zone (in mm) of 11 isolates.

Gupta (1974), a rapporté qu'il y avait même des différences dans la nature de ces composés, en fonction de l'interaction plante hôte-agent pathogène. Les isolats les plus riches en protéines sont les plus pathogènes sur tomate et les moins pathogènes sur luzerne. On peut donc penser que plus la quantité de protéines augmente, plus la virulence vis-à-vis de la tomate s'accroît, à l'inverse de la luzerne dont les isolats présentent les quantités de protéines les plus faibles.

La mise en évidence des activités enzymatiques révèle que les lignées de plus en plus adaptées à la luzerne synthétisent les pectinases avec des taux croissants, en fonction du " degré " d'adaptation acquise. Il y a donc une corrélation positive entre l'activité enzymatique et le degré d'adaptation des divers isolats à la luzerne.

Il y a également une corrélation positive entre l'activité carboxyméthylcellulase et la source de carbone d'une part, et la croissance des isolats testés d'autre part : cette activité est absente sur pectine, mais présente sur glucose chez tous les isolats à l'exception de L<sub>8</sub>, L<sub>9</sub> et E<sub>27</sub>. Ceci n'exclut pas que ces derniers soient capables de la synthétiser, mais ils sont sans doute limités par la nature de la source du carbone. En effet Gupta & Heale (1971), n'ont pas détecté d'activité cellulase chez *Verticillium albo-atrum* dans un milieu minimum plus glucose ; ils ont plutôt conclu que seules la cellulose et la cellobiose sont capables d'induire une telle activité.

L'isolat de *Verticillium* d'origine tomate, a donc surtout une grande activité cellulase ; celle-ci est progressivement dégradée sous la pression de l'hôte luzerne, pour disparaître chez l'isolat L<sub>9</sub> adapté à la luzerne. Cette perte est compensée par l'acquisition progressive des activités pectinases. Vasiliev *et al.* (1992) ont montré que l'activité caseine kinase chez *Verticillium dahliae* disparaît sous l'effet du choc thermique, alors que dans cette étude, l'activité carboxyméthylcellulase a disparu, sous l'effet d'un choc d'une autre nature : la pression de l'hôte luzerne. On pourrait en déduire que la nature des enzymes extracellulaires sécrétées par les isolats de *Verticillium* est étroitement liée aux conditions du milieu de culture.

Selon Kratka & Kudela (1981), la différence entre les plants de luzerne sensibles et résistants au *Verticillium albo-atrum* est due essentiellement à l'activité cellulolytique.

De tout ce qui précède, il ressort que ces activités enzymatiques sont étroitement liées à la source de carbone dans le milieu : ceci est en accord avec les observations de Gupta & Heale (1971) et Carder *et al.* (1987) ; également au degré d'adaptation des différents isolats issus de P<sub>3</sub>.S (d'origine tomate) à la Luzerne.

Nos résultats laissent donc supposer que les parois squelettiques de la tomate et de la luzerne diffèrent par leur composition. À la suite d'inoculations et de réisolements successifs sur luzerne, l'isolat P<sub>3</sub>.S semble activer des gènes différents, commandant les activités enzymatiques aptes à dégrader la paroi de cette plante.

L'adaptation progressive de *Verticillium dahliae* d'origine tomate à la luzerne, est donc la conséquence d'un ensemble de modifications affectant la synthèse des protéines et les activités pectocellulolytiques du pathogène, suite de la pression effectuée sur lui par la plante hôte.

REMERCIEMENTS : Nous remercions chaleureusement Dr. M. Bourdi, Laboratoire de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire (Bethesda, Maryland), pour la documentation qu'il nous a fournie.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARIMA K., SAKAMOTO T., ARAKI C. & TAMURA G., 1972 — Production of extra cellular L — Asparaginases by micro-organisms. *Agronomical biological chemistry* 36(3) : 356-361.  
BRADFORD M., 1984 — *Bio. Rad. Protein assay instruction manual for research use only* Biorad. Chemical division, 1-17.

- CHAIBN., 1987 — Contribution à l'étude des relations entre les variations morphologiques et le pouvoir pathogène du *Verticillium albo-atrum* R. & B. forme à microsclérotos. Analyse des substances phytotoxiques. Diplôme de spécialité de 3<sup>e</sup> cycle. Université Mohammed V, Rabat. 168 pp.
- CARDER J.H., HIGNETT C & SWINBURNE T.R., 1987 — Relationship between the virulence of hop isolates of *Verticillium albo-atrum* and their *in vitro* secretion of cell wall degrading enzymes. *Physiological and molecular plant pathology* 31 : 441-452.
- DURRAND P.K. & COOPER R.M., 1988 — Selection and characterization of pectinase deficient mutant of the vascular wilt pathogen *Verticillium albo-atrum*. *Physiological and molecular plant pathology* 32 : 343-362.
- EL AISSAMI A., 1990 — Contribution à l'étude de la verticilliose de la luzerne : variabilité de la spécificité parasitaire et analyse de quelques mécanismes d'action du parasite. Diplôme de spécialité de 3<sup>e</sup> cycle. Université Mohammed V, Rabat. 187 pp.
- GUPTA D.P. & HEALE J.B., 1971 — Introduction of cellulase (cx) in *Verticillium albo-atrum*. *Journal of general microbiology* 63 : 163-173.
- GUPTA D.P., 1974 — A dix electronic study of the protein of susceptible tolerant and resistant lucerne with reference to *Verticillium* wilt. *Indian phytopathology*, 27(4) : 542-548.
- KRATKA J., 1980 — Enzymatic activity in *Verticillium albo-atrum*. *Zbl. Bact. II ABt.* 135, 630-635.
- KRATKA J. & KUDELA V., 1981 — Biochemical changes in Alfalfa plants inoculated with *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathologische Zeitschrift* 100 : 289-299.
- JEREBZOFF-QUINTIN S. & JEREBZOFF S., 1980 — Métabolisme de l'asparagine et rythme endogène de sporulation chez le *Leptosphaeria michotii* (West.) Sacc. *Physiologie végétale* 18(1) : 147-156.
- LANGEN G., BEIBMANN B., REISENER H.J. & KOGEL K., 1992 — A- $\beta$  1,3 D endomannanase from culture filtrates of the hyperparasites *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album* that specifically lyses the germ pore plug from Uredospores of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. *Canadian journal of botany* 70 : 853-860.
- PAGE M.S., GRAY F.A., LEGG D.E. & KEARL W.G., 1992 — Economic impact and management of *Verticillium* wilt on irrigated Alfalfa Hay production in Wyoming. *Plant disease* 76 : 504-508.
- PENNYPACKER B.W., KNIVEL D.P., RISIUS M. & LEATH K.T., 1994 — Photosynthetic Photon Flux Density X. Pathogen interaction in growth of Alfalfa infected with *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 84 : 1350-1358.
- SAKSIRIRATE W. & HOPPE H.H., 1991 — Secretion of extracellular enzymes by *Verticillium psalliotae* Treschow and *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas during growth uredospores of the soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in liquid cultures. *Journal of phytopathology* 131 : 161-173.
- SEBTIS., 1982 — Essai d'analyse des composantes du pouvoir pathogènes de *Verticillium albo-atrum* R. & B. Thèse doctorat de 3<sup>e</sup> cycle. Université Paris Sud, Orsay. 160 pp.
- VASILIEV A.O., KAPKOV D.V., KANDROR K.V., & STEPPANOV A.S., 1992 — Expression and regulation of casein kinase 2 during heat shock in *Verticillium dahliae*. *Molecular reproduction and development* 31 : 42-47.
- WHITNEY P.J., HEALE J.B. & VAUGHAN J.G., 1972 — Protein changes in the vascular wilt disease of Lucerne caused by *Verticillium albo-atrum* R. & B. *Journal of experimental botany* 23 (75) : 400-414.